第 41 卷 第 3 期
1998 年 8 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol. 41, No. 3
Aug., 1998

苦皮藤素 V 对东方粘虫中肠细胞及其消化酶活性的影响*

刘惠霞 董育新 吴文君
（西北农业大学植物保护系，杨陵 712100）

摘要 苦皮藤素 V 是从杀虫植物苦皮藤 *Celastrus angulatus* Max. 根皮中分离的一种对昆虫具有毒杀活性的新化合物。该文通过电镜观察和生化分析研究了其对东方粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 幼虫中肠组织及中肠主要消化酶活性的影响。电镜观察发现，中毒试虫的中肠细胞及其细胞器发生明显病变：柱状细胞顶膜微绒毛零乱、减少；线粒体肿胀，出现空白亮区，双层膜不完整；细胞质密度降低，细胞器排列紊乱；内质网池扩张，囊泡化，粗面内质网减少；杯状细胞杯腔变大，微绒毛减少。消化酶活性测定结果表明，中毒试虫中肠的蛋白酶、淀粉酶及脂肪酶的活性和正常虫相比，无显著变化。因此认为，苦皮藤素 V 主要作用于中肠细胞的质膜及其内膜系统。

关键词 苦皮藤素 V，超微结构，消化酶，东方粘虫

苦皮藤素 V 是从杀虫植物苦皮藤 *Celastrus angulatus* Max. 根皮中分离的一种重要的毒杀活性成分，对昆虫主要表现为胃毒作用，对 5 龄东方粘虫 *Mythimna separata* (Walker) 幼虫的致死中量为 68.5 μg/g。试虫食毒后，先是表现兴奋、虫体扭曲、抽搐，继而呕吐泻泄，试虫体液大量流失[1]。为了明确苦皮藤素 V 的作用部位和作用机理，为生物合理设计创制新型杀虫剂奠定基础，我们以东方粘虫幼虫为试虫观察了中毒试虫中肠细胞超微结构变化并测定了对中肠消化酶活性的影响。

1 材料和方法

1.1 试虫

室内 18～24℃条件下以小麦苗饲养的东方粘虫幼虫。

1.2 药剂

从苦皮藤根皮中提取分离的苦皮藤素 V (2β，8α-乙酰氧基-9β-苯甲酰氧基-1β，12-异丁酰氧基-4α，6α-羟基-β-二氢沉香呋喃)，纯度为 95.6%，配成 1.5%的丙酮溶液供试。

1.3 电镜观察

挑选蜕皮后 1 天的 5 龄幼虫，饥饿 8 h，随机分成两组（处理组和对照组）。在 0.5 cm ×0.5 cm 小麦叶片上点涂 1 μL 1.5%苦皮藤素 V 的丙酮溶液，溶剂挥发后喂虫，一虫一

* 国家自然科学基金资助课题
1996-06-10 收稿，1997-10-10 收修改稿

叶，即为处理组；对照组试虫饲喂点涂1 μL丙酮的叶片。分别于处理组试虫的抽搐期、失水初期，失水末期在冰浴中解剖试虫，取出中肠，用预冷的生理盐水冲洗出食物残渣。将组织投入4%戊二醛，低温条件下前固定，用1%的锇酸后固定。组织经系列丙酮脱水后用Epon 812包埋，35℃、45℃、60℃各聚合1天，LKBV型超薄切片机切片，再以醋酸铀和柠檬酸铅双重染色，最后用JEM-200EX电镜观察并照相。

1.4　消化酶活性测定

挑选蜕皮后1天的6龄粘虫幼虫，饥饿8 h。处理试虫饲喂点涂有1 μL 1.5%苦皮藤素V丙酮液的小麦叶片（0.5 cm×0.5 cm），对照试虫饲喂点涂有1 μL丙酮的小麦叶片（0.5 cm×0.5 cm）。待处理试虫出现抽搐症状时，用镊子轻轻夹住虫体，将其头部放在1.5 mL离心管管口，轻压其腹部，在冰浴中收集其返吐液，同时收集对照试虫的返吐液。以12 000 r/min离心15 min，上清液分装后－12℃保存备用。待有失水症状出现时，同样分别收集对照和处理试虫的返吐液并作离心处理。

测定蛋白质含量参照张龙翔等方法[2]，测定蛋白酶活性参照沙槎云等方法[3]，测定淀粉酶活性参照施特尔马赫的方法[4]，测定脂肪酶活性参照刘维德、G.P. 齐治欧的方法[5]。

2　结果与分析

2.1　中肠肠壁细胞及其细胞器的组织学病变

电镜观察表明，对照组粘虫中肠柱状细胞顶膜微绒毛排列整齐有序（图版Ⅰ：1），线粒体双层膜完整，内嵴清晰可见（图版Ⅰ：5），细胞质密度高，细胞器排列有序（图版Ⅱ：1），粗面内质网排列整齐，表面附着大量的核糖体（图版Ⅱ：4），杯状细胞杯腔面突起呈排列整齐的微绒毛（图版Ⅱ：7）。取食苦皮藤素V后，抽搐期柱状细胞顶膜微绒毛虽无明显变化（图版Ⅰ：2），但细胞器已开始瓦解密度降低（图版Ⅱ：2）；线粒体肿胀，出现空白亮区（图版Ⅰ：6）；内质网小池扩张，粗面内质网减少（图版Ⅱ：5）。杯状细胞杯腔面微绒毛减少（图版Ⅱ：8）。失水期，细胞及细胞器进一步瓦解（图版Ⅱ：3），柱状细胞微绒毛数量减少、零乱（图版Ⅰ：3），至失水末期几乎消失（图版Ⅰ：4）；线粒体被严重破坏，外室水肿，嵴紊乱、模糊不清，双层膜亦不清晰（图版Ⅰ：7）。内质网池扩张，囊泡化，粗面内质网大量减少（图版Ⅱ：6）。杯状细胞杯腔变大，微绒毛进一步减少（图版Ⅱ：9）。

苦皮藤素V对细胞核、溶酶体及肌细胞无明显影响。

上述结果表明，苦皮藤素V对粘虫中肠肠壁细胞的质膜及内膜系统均有破坏，致使细胞膜失去固有的屏障作用；失去正常渗透平衡，继而细胞器也遭到不同程度的破坏，细胞丧失正常的生理功能。中毒试虫失水期细胞微绒毛大量减少的直接后果是细胞膜穿孔，体液穿过肠壁细胞大量流入消化道，引起昆虫呕吐与泻泄，失水过多致死。由于内膜系统的损伤，水分子通过损伤部位进入细胞器内，表现为内质网池扩张，严重时内质网池囊泡化，粗面内质网大量减少，线粒体肿胀，外室水肿，最终导致嵴模糊不清，趋于融合，功能丧失，能量代谢受到抑制[6,7]。

此外，溶酶体未见明显病变，说明苦皮藤素V对肠壁细胞的破坏不是由于溶酶体膜

被破坏，各种水解酶进入细胞质而导致的细胞自溶。

2.2 中肠消化酶活性的变化

苦皮藤素V处理后试虫消化道几种主要消化酶活性的变化如表1所示。从表1可以看出，试虫取食苦皮藤素V后，无论是抽搐期还是失水期，中肠蛋白酶、淀粉酶及脂肪酶的比活力均比未处理对照试虫有所降低，但方差分析结果表明，其差异均未达到显著水平。因此认为，苦皮藤素V对东方粘虫幼虫中肠的几种消化酶（蛋白酶、淀粉酶及脂肪酶）活性没有显著影响。

表1 苦皮藤素V处理粘虫幼虫后中肠主要消化酶活性变化

处理	样品中蛋白质含量（mg/mL）	蛋白酶比活力[a]（μg/（mg·min））	淀粉酶比活力[b]（mg/（mg·min））	脂肪酶比活力[c]（μg/（mg·min））
食毒后抽搐期试虫	3.25	1 710.1	1.61	31.6
未食毒对照试虫	3.15	1 836.6	1.77	37.2
食毒后失水期试虫	2.74	1 959.4	1.74	35.6
未食毒对照试虫	2.63	2 151.6	1.92	44.4

注：a. 比活力的单位为酪氨酸μg/（mg·min）；b. 比活力的单位为麦芽糖mg/（mg·min）；c. 比活力的单位为甘油三酯μg/（mg·min）

3 讨论

苦皮藤素V是一种胃毒剂，试虫取食后表现的中毒症状为兴奋，虫体扭曲，抽搐，继而呕吐、泻泄，体液流失，最终死亡。其作用部位可能是中肠细胞质膜及内膜，使肠壁穿孔，体液流失。至于其作用机理，有一种可能是由于溶酶体破裂释放的水解酶进入细胞质而引起细胞自溶，但电镜观察结果未见溶酶体有明显病变。此外，苦皮藤素V中毒较轻的试虫少量失水后不会死亡，可以恢复，而若是溶酶体破裂导致的细胞自溶则不会很快修复。因此，肠壁穿孔并非由于溶酶体破裂而引起，苦皮藤素V的初始靶标不是溶酶体而是细胞质膜及细胞器的膜系统。至于溶酶体膜及核膜未观察到明显病变可能是由于苦皮藤素V的靶标选择性所致，尚需深入研究。

苦皮藤素V引起的昆虫中毒症状很大程度上类似于苏云金杆菌δ-内毒素的作用症状，而且中肠组织病变的电镜观察结果也相似，都损伤中肠细胞微绒毛，使内质网池扩张，核糖体脱落，线粒体肿胀等[8~10]。苏云金杆菌δ-内毒素的作用机理为δ-内毒素首先在中肠碱性条件下转变为小分子肽，经中肠蛋白酶活化后与细胞膜上的糖蛋白或不饱和磷脂结合，毒素分子插入质膜形成穿孔，允许小分子及离子通过，渗透膨胀引起穿孔扩大，最终导致细胞瓦解[11,12]。因此，苦皮藤素V对质膜及内膜系统的破坏也可能是苦皮藤素V与膜上受体结合，使膜蛋白的构像改变，分子、离子的通透性改变，渗透平衡失常，水分子，离子从血液进入细胞膜和细胞器，细胞膨胀，穿孔扩大，最终导致细胞瓦解。但苦皮藤素V在东方粘虫中肠上皮细胞上的结合位点与苏云金杆菌δ-内毒素不一定相同，尚需进一步深入研究。

参　考　文　献

1　吴文君等. 新化合物苦皮藤素Ⅴ的分离与结构鉴定. 西北农业大学学报，1994，22（4）：116～117

2　张龙翔等. 生化实验方法和技术. 北京：高等教育出版社. 1984

3　沙槎云等. 粘虫肠道蛋白酶在苏云金杆菌肯尼亚变种“7407”晶体致病中的作用. 昆虫学报，1981，24（3）：237～243

4　施特尔马赫·B·（钱嘉渊译）. 酶的测定方法. 北京：轻工业出版社. 1992

5　刘维德，G. P. 齐治欧. 双硫磷诱导抗有机磷致乏库蚊酯酶活性的增强. 昆虫学研究集刊，1983，（3）：65～72

6　杭振镳等. 电子显微镜技术在临床医学的应用. 重庆：重庆出版社. 1988

7　金·D. W. 等. 病理生物学. 北京：人民卫生出版社. 1988

8　Endo Y. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol., 1980, 36: 90～103

9　Percy J. *Bacillcus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. J. Invertebr. Pathol., 1983, 41: 86～98

10　王　程等. 苏云金杆菌感染粘虫后中肠组织学病变的研究. 昆虫学报，1991，34（1）：50～52

11　Denolf D *et al.* Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptors in the midgut brush border membrane of the European corn border, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59: 1 828～1 837

12　Gill S S *et al.* The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol., 1992, 39: 615～636

EFFECTS OF CELANGULIN V ON THE MIDGUT CELLS AND THE DIGESTIVE ENZYME ACTIVITIES OF *MYTHIMNA SEPARATA* (WALKE) LARVAE

Liu Huixia　　Dong Yuxin　　Wu Wenjun

(Department of Plant Protection, Northwestern Agricultrual University, Yangling　712100)

Abstract　Celangulin V isolated from the root bark of the plant *Celastrus angulatus* is a new insecticidal compound. The effects of celangulin V on the midgut cells and digestive enzyme activities of *Mythimna separata* larvae were determined by means of electron microscopy and biochemical analysis. It was observed that the midgut cells and their organelles of poisoned larvae exhibited distinct pathological changes: the microvilli of the column cell were disordered and the number of microvilli was decreased markedly, the basal infolding of the cell membrane was enlarged, in which the number of mitochondria was decreased. It was also observed that mitochondria had irregularly enlarged, the bilayer membrane was not intact, the cisternae of rough endoplasmic reticulum were distended; the cavity of goblet cell was enlarged, in which the microvilli came off. The results of biochemical analysis showed that the activities of protease, amylase and lipase of

the poisoned larval midgut had no significant changes compared with the normal larval midgut. It is thus suggested that celangulin V might act on the plasmalemma and the organelle membrane of the midgut cells.

Key words celangulin V, ultrastructure, digestive enzymes, *Mythimna separata* (Walker)

图 版 说 明

图 版 I

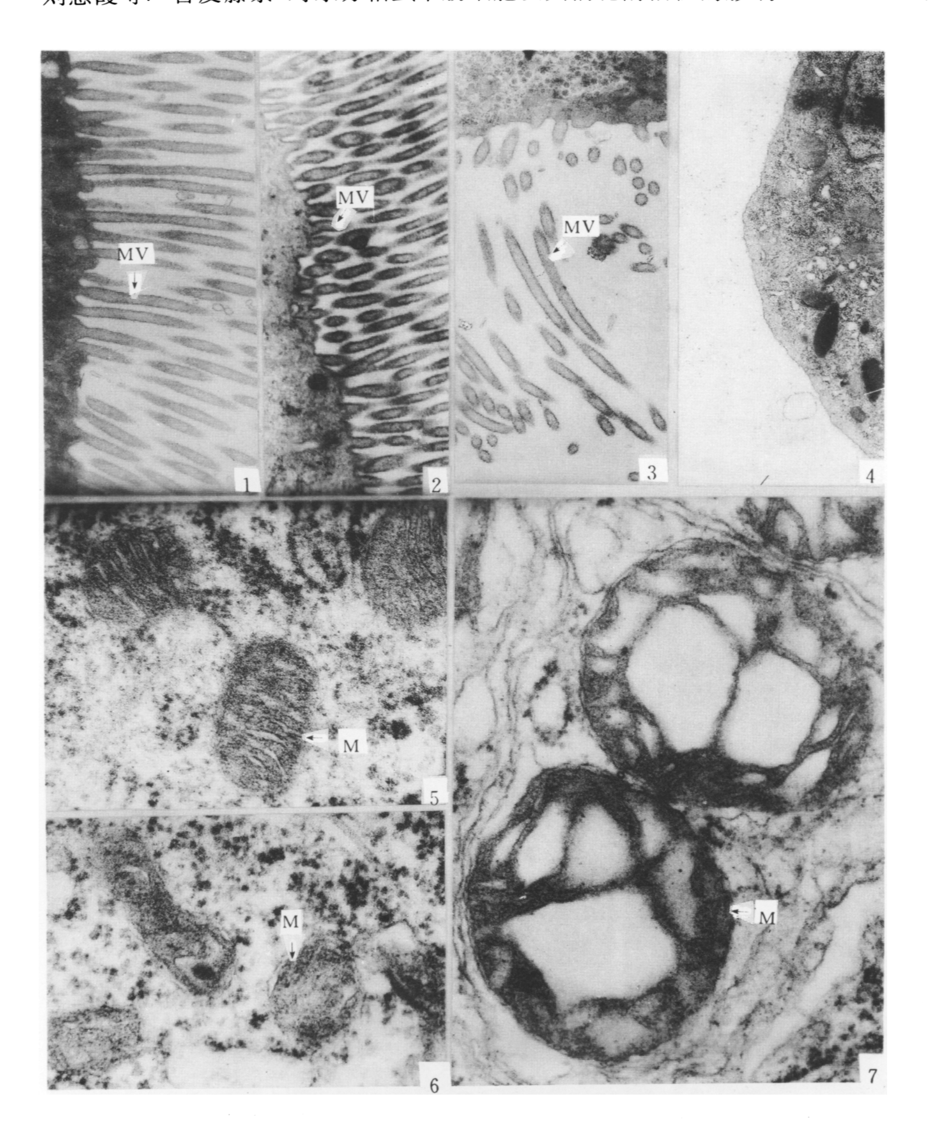
1. 对照组粘虫中肠柱状细胞顶膜微绒毛（MV）排列整齐有序（13 000×）；
2. 处理组粘虫中毒抽搐期中肠柱状细胞顶膜微绒毛（MV）无明显变化（13 000×）；
3. 处理组粘虫中毒失水期中肠柱状细胞顶膜微绒毛（MV）数量减少，排列紊乱（13 000×）；
4. 处理组粘虫中毒失水末期中肠柱状细胞顶膜微绒毛（MV）几乎消失（13 000×）；
5. 对照组粘虫中肠柱状细胞线粒体（M）双层膜完整，嵴清晰可见（52 000×）；
6. 处理组粘虫中毒抽搐期线粒体（M）肿胀，双层膜不完整，嵴崩散（52 000×）；
7. 处理组粘虫中毒失水期线粒体（M）外室水肿，双层膜部分消失，嵴紊乱、出现空腔（52 000×）。

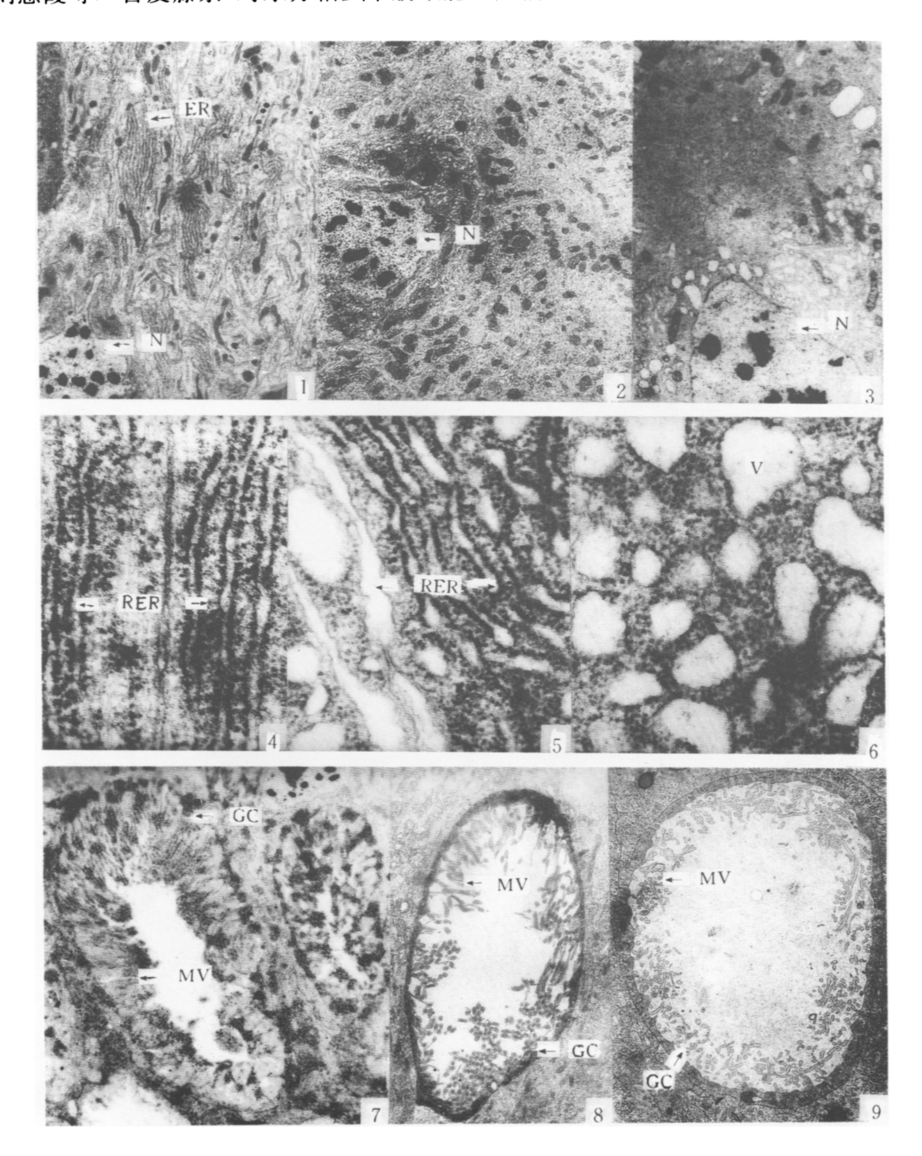
MV：微绒毛；M：线粒体

图 版 Ⅱ

1. 对照组粘虫中肠柱状细胞的细胞质密度高，细胞器排列整齐有序（3 500×）；
2. 处理组粘虫中毒抽搐期中肠柱状细胞器开始瓦解，细胞质密度降低（3 700×）；
3. 处理组粘虫中毒失水期中肠柱状细胞细胞器进一步瓦解，细胞质密度更低（4 900×）；
4. 对照组粘虫中肠柱状细胞粗面内质网 RER 排列整齐，其上附着大量核糖体（45 000×）；
5. 处理组粘虫中毒抽搐期中肠柱状细胞内质网小池扩张，粗面内质网减少（35 000×）；
6. 处理组粘虫中毒失水期中肠柱状细胞内质网小池继续扩张，呈囊泡化（V）（38 000×）；
7. 对照组粘虫中肠杯状细胞（GC）杯腔面突起呈微绒毛（MV），且排列规则（2 700×）；
8. 处理组粘虫中毒抽搐期中肠杯状细胞（GC）杯腔面微绒毛（MV）减少（3 500×）；
9. 处理组粘虫中毒失水期中肠杯状细胞（GC）杯腔变大、微绒毛（MV）进一步减少（3 500×）。

N：细胞核；ER：内质网；RER：粗面内质网；MV：微绒毛；V：囊泡；GC：杯状细胞


MV
MV
MV
1
2
3
4
M
5
M
6
M
7


ER
N
1
N
2
N
3
RER
4
RER
5
V
6
GC
MV
7
MV
GC
8
MV
GC
9